

Vergleich der Primärstrukturen multipler und differenter Lactatdehydrogenasen

Klaus Rajewsky

Frankfurt am Main 1962

Aus dem Institut für Biochemie
(Direktor: Prof. Dr. G. PFLEIDERER)

im Institut für organische Chemie der Universität
Frankfurt a.M.

(Direktor: Prof. Dr. Th. WIELAND)

Vergleich der Primärstrukturen multipler
und differenter Lactatdehydrogenasen

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der gesamten Medizin
der hohen Medizinischen Fakultät
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
zu Frankfurt am Main

vorgelegt von

Klaus Rajewsky
aus Frankfurt am Main

Frankfurt/M. 1962

Dekan : Prof. Dr. K. Herzberg

Referent : Prof. Dr. G. Pfeleiderer

Korreferenten : Prof. Dr. E. Heinz und Prof. Dr. H. Fischer

Mündliche Prüfung : 2. Oktober 1962



Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung und Problemstellung	1
2. Methodik	5
A. Einleitung	5
B. Die Eiweißpräparate	5
C. Die tryptischen Verdauungen	13
D. Vergleich der tryptischen Spaltprodukte	17
3. Experimente und Ergebnisse	23
4. Besprechung der Ergebnisse	25
5. Zusammenfassung ,.....	30

1. Einleitung und Problemstellung

Begriffsbestimmung: Als homotrope Enzyme bezeichnet man Enzyme gleicher Funktion, die sich physikalisch, chemisch und biochemisch voneinander unterscheiden. Solche homotropen Enzyme, die verschiedener Organherkunft sind oder von verschiedenen Arten von Lebewesen stammen, nennen wir differente Formen von Enzymen; homotrope Enzyme, die nebeneinander im Parenchym derselben Organe auftreten, werden als multiple Enzymformen oder als Isozyme bezeichnet. Dem Oberbegriff "homotrope Enzyme" werden also 2 Unterbegriffe "differente Formen eines Enzyms" und "multiple Formen eines Enzyms (= Isozym)" zugeordnet.

Während sich bei der Erforschung der Coenzyme bald eine einfache Systematik der wenigen in der Natur vorkommenden Typen ergab, scheint die Biochemie mit den Apoenzymen weit schwieriger zu fassende Objekte vor sich zu haben. In den letzten 2 Jahrzehnten ist durch eine Vielzahl von Arbeiten gezeigt worden, daß hier der so klar durchführbaren Klassifizierung bezüglich der Funktion nicht eine ebenso einfache bezüglich des chemischen Aufbaus entspricht. Die Prägung des Begriffs "homotrope Enzyme" spiegelt dies wider. Nicht nur unterscheiden sich Enzyme gleicher Funktion voneinander, wenn sie aus phyllogenetisch sehr weit voneinander entfernten Organismen gewonnen werden - wenn auch die Reihe der Entdeckungen homotroper Enzyme an einer solchen Stelle beginnt: mit der Entdeckung von Otto WARBURG nämlich, daß tierische Aldolase und Aldolase aus Hefe ganz verschieden gebaute Eiweißkörper sind (1)* - sondern auch solche, die aus gleichen Organen nah verwandter Tiere stammen, weisen Unterschiede auf (Vergleich menschlicher und verschiedener tierischer Lactatdehydrogenasen durch G. PFLEIDERER (2) und viele andere Arbeiten).

Wirklich überraschend war dann aber erst der Befund, daß sogar ein einzelner Organismus je nach Organ unterschiedlich gebaute Enzyme gleicher Funktion zu produzieren ver-

* der im Folgenden in Andeutungen gegebene Überblick über die Entstehungsgeschichte des hier betrachteten Forschungsgebietes bezieht sich in manchem auf eine kürzlich erschienene Darstellung desselben durch Th. WIELAND und G. PFLEIDERER (3).

mag, was erstmalig G. PFLEIDERER und D. JECKEL 1957 nachgewiesen haben (4); und schließlich die Entdeckung multipler Enzymformen, d.h. unterschiedlich gebauter Enzyme gleicher Funktionen in einem einzigen Organparenchym. Hierzu sei nur das Beispiel der LDH^{*} genannt, von der Th. WIELAND, G. PFLEIDERER und Mitarb. multiple Formen in einer ganzen Reihe von Organextrakten gefunden haben; eine Zusammenstellung aller bisherigen Befunde erlaubt die Fülle der Literatur nicht mehr.

In der Medizin hat die Entdeckung, daß homotrope, unterschiedlich gebaute Enzyme in einem Organismus - auch dem menschlichen - organspezifisch vorkommen können, rasch zu einer Reihe praktischer Nutzenwendungen geführt. Heute schon spielt in der Diagnostik der Nachweis organspezifischer Enzyme bzw. Enzymmuster eine große Rolle (5). Auch die Lactatdehydrogenasen haben diagnostische Bedeutung. Bei Krankheiten des Herzens und der Leber, die mit Nekrosen im Gebiet dieser Organe verknüpft sind (vor allem beim Herzinfarkt, bei Hepatitiden, bei der akuten gelben Leberdystrophie) treten organspezifische Transaminasen und Lactatdehydrogenasen im Blut auf. Beim Ikterus läßt sich in zweifelhaften Fällen an Hand des Musters der ins Blut ausgeschwemmten multiplen LDHs klären, ob er durch eine Leberaffektion oder durch hämolytische Vorgänge hervorgerufen ist. (6).

In der biologischen Wissenschaft rührte die genannte Entdeckung grundlegende Fragen an. Auf sie soll weiter unten bei der Besprechung der Ergebnisse der Arbeit eingegangen werden, damit diese gleich mit einbezogen werden können.

Die vorliegende Arbeit sollte Antwort auf die Frage geben, ob sechs homotrope Enzymproteine, die teils differente, teils multiple Lactatdehydrogenasen darstellen, neben ihren bisher bekannten Unterschieden im physikalischen und biochemischen Verhalten auch verschiedene Primärstrukturen besitzen oder nicht. Dies ist keineswegs selbstverständlich. Wie Th. WIELAND und G. PFLEIDERER (3) angeben, hängt beispielsweise die Beweglichkeit von Eiweißkörpern im elektrischen

* Verzeichnis der Abkürzungen siehe Seite 31

Feld, abgesehen von der Bedeutung, die der Art und dem Mengenverhältnis der formal ihnen zu Grunde liegenden Aminosäuren in dieser Hinsicht zukommt, von folgenden Bedingungen ab: Zahl der acylierten (ursprünglich freien) Aminogruppen, Zahl der durch Säureamidbildung neutralisierten (ursprünglich freien) Carboxylgruppen, Gehalt an festgebundenem Phosphat oder Sulfat, Gehalt an Metallen. Die beiden zuletzt genannten Bedingungen sind aber nicht durch die Primärstruktur gegeben. Ganz allgemein sind für das physikalisch-chemische Verhalten von Eiweißkörpern neben der Primärstruktur derartige Faktoren von ausschlaggebender Bedeutung, wobei noch durch Sekundär- und Tertiärstruktur gegebene Bedingungen nicht vergessen werden dürfen.

Die Frage nach Unterschieden in der Primärstruktur zu beantworten ist wichtig, weil die Primärstruktur der unmittelbarste Ausdruck der Synthese eines Eiweißkörpers ist und Unterschiede in der Primärstruktur mit grosser Sicherheit den Schluß auf unterschiedlich verlaufende Synthese und damit auf unterschiedlich gesteuerte Synthese durch die Erbsubstanz zulassen. Und gerade in diese Richtung zielen die in allgemein-biologischer Sicht bedeutenden Fragen, auf die die Existenz einer Vielfalt homotroper Enzyme in einem Organismus aufmerksam macht, Fragen nämlich, die sich mit dem Problem befassen, wie diese Vielfalt sich aus der einheitlichen Erbsubstanz herleitet.

In Tab. 1 sind die untersuchten Enzyme und ihre charakteristischen physikalischen und biochemischen Eigenschaften zusammengestellt. Wenn die Frage nach Unterschieden in ihrer Primärstruktur beantwortet werden kann, erlaubt die Auswahl der Enzyme einige charakteristische Vergleiche:

1. Vergleich der Primärstruktur von LDHs aus gleichen Organen verschiedener Tiere (R_H - und S_H -LDH, R_S - und K_S -LDH^{*}).
2. Vergleich der Primärstruktur von LDHs verschiedener Organe des gleichen Tieres (R_H - und R_S -LDH).
3. Vergleich der Primärstruktur multipler LDHs aus dem Rattenherzen.

Für die beiden letztgenannten Fälle gab es vor dieser Arbeit noch keine vergleichbaren Angaben.

* Verzeichnis der Abkürzungen siehe Seite 31.

Enzym	Molekulargewicht	pH-Optimum	BTS-Optimum	Umsatzzahl (bei pH- u. BTS-Optimum)	Sulfithembarkeit (% Hemmung in $2 \cdot 10^{-5}$ M Sulfith)	BTS-Optimum	Temperaturkoeffizient	Wanderung im elektrischen Feld pH 8,6
K_S -LDH	130000	7,0	$3 \cdot 10^{-6}$	55000	11	13	1,65	fast neutral
R_S -LDH	130000	7,4	$2 \cdot 10^{-6}$	67000	26	27	1,85	fast neutral
S_H -LDH	130000	6,8	$5 \cdot 10^{-7}$	37000	68	50	1,48	anodisch
R_H -LDH	130000	6,8	$6,5 \cdot 10^{-7}$	21000	58	45	1,75	5 Banden 1-4 anodisch 5 kathodisch
R_{H1} -LDH	130000	7,2	$6,5 \cdot 10^{-7}$		63,5		1,90	anodisch
R_{H2} -LDH	130000	6,8	$6,5 \cdot 10^{-7}$		56		1,83	anodisch (langsamere als R_{H1} -LDH)
R_{H3} -LDH	130000							anodisch (langsamere als R_{H2} -LDH)

Tab. 1

Methodik

A. Einleitung

Sollen Eiweißkörper bezüglich ihrer Aminosäuresequenz miteinander verglichen werden, so genügt es, will man eine sichere Antwort bekommen, nicht, sie bis herunter zu den Aminosäuren zu hydrolysieren und den Gehalt an einzelnen Aminosäuren im Aminosäureanalysator zu messen. Nicht nur, daß diese Methode versagt, wenn es um feinste Unterschiede im Aminosäuregehalt geht (7); sondern selbst Eiweißkörper gleicher Aminosäurezusammensetzung können durchaus verschiedene Sequenz der Aminosäuren haben.

Zu eindeutigen Aussagen gelangt man dagegen, wenn man die zum Vergleich stehenden Eiweißkörper in definierter Weise in kleinere Bruchstücke zerlegt und diese Bruchstücke miteinander vergleicht. Definiert ist die Spaltung dann, wenn sie streng sich nur dort vollzieht, wo eine bestimmte bekannte Konstellation der das Eiweiß aufbauenden Aminosäuren gegeben ist. Chemisch ist eine solche Spaltung an Eiweißen hohen Molekulargewichts heute noch nicht durchzuführen. Es ist aber in der Biochemie ein proteolytisches Enzym bekannt, das sich dieser Forderung genau entsprechend verhält: das Trypsin. Es spaltet die Eiweißkörper dort, wo sich die Carboxylgruppe einer der basischen Aminosäuren Arginin oder Lysin mit der Aminogruppe irgendeiner anderen Aminosäure verbindet (8).

Dementsprechend wurden die zum Vergleich vorliegenden Enzymproteine einer tryptischen Verdauung unterzogen. Die Spaltprodukte wurden verglichen.

B. Die Eiweißpräparate

- a) Serumalbumin reinst, kristallisiert, von den BEHRING-Werken.
- b) Die Lactatdehydrogenasen

- 1.) Allgemein angewandte Methoden bei der Darstellung
 - α) Bestimmung der Umsatzzahlen nach dem WARBURG'schen optischen Test (9) (10).

Prinzip: Man läßt eine bestimmte Menge Enzym auf BTS einwirken in Gegenwart von DPNH; unter der Reaktion

wird DPNH zu DPN und man kann den Ablauf der Reaktion an der Abnahme der Extinktion bei 366 m μ verfolgen. Man wählt eine optimale BTS-Konzentration und arbeitet bei 25° C. Dann kann die Umsatzzahl berechnet werden.

$$\text{Umsatzzahl} = \frac{\Delta \text{Extinkt.} / 60 \text{ sec} \cdot \text{Molekulargewicht LDH}}{\epsilon_{366 \text{ m}\mu}^{\text{DPN}} \cdot \text{Eiweißgehalt der Testlösung}}$$

wobei ϵ der Extinktionskoeffizient

- B) Der Eiweißgehalt der Lösungen wurde mit Hilfe der nach WEICHSELBAUM modifizierten Biuretmethode bestimmt (11).
- γ) Aktivitätsbestimmung (10). Bei den während der Aufarbeitungen notwendigen Aktivitätsmessungen braucht nicht jeweils die Umsatzzahl bestimmt zu werden; sondern man bestimmt die Zahl der "Fermenteinheiten", die sich in der jeweiligen Lösung befinden, in folgender Weise: In eine 3,5 ml-Rundküvette werden 3,4 ml m/15 Phosphat-Puffer pH 7,2, 0,03 ml m/10 BTS, 0,05 ml einer DPNH-Lösung (50 mg in 4 ml Wasser) einpipettiert, dazu 0,01 - 0,02 ml der passend verdünnten zu testenden Lösung. Man mißt dann sofort im Photometer Eppendorf die Zeit der Extinktionsabnahme bei 366 m μ um 0,1. Dann können die "Fermenteinheiten" in folgender Weise berechnet werden:

$$\frac{100}{\text{Zeit d. Extinktionsabn. um } 0,1 [\text{sec}]} = \text{"Fermenteinheiten" in der Küvette}$$

wobei die Extinktionsabn. als $\Delta \log_{10} i$ bestimmt wird.

Die Gleichung gibt also die Definition der Größe "Fermenteinheiten" an. Die im Nenner stehende Zeitangabe muß > 30 sein; andernfalls besteht zwischen Enzymmenge und Reaktionsgeschwindigkeit keine Proportionalität mehr (2). Man hat anschließend noch auf das Gesamtvolumen der Lösung umzurechnen.

- 2.) Die Darstellung der einzelnen LDHs.
- α) Schweineherz-LDH wurde nach einer Vorschrift von

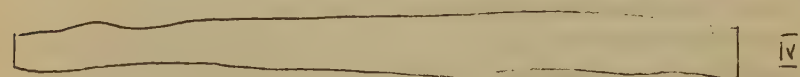
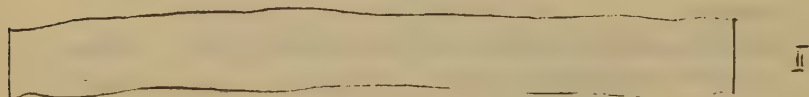
G. PFLEIDERER und D. JECKEL (4) dargestellt, in der die Angaben von F. B. STRAUB (12) abgeändert sind.

- B) Rattenskelettmuskel-LDH stellten wir ebenfalls nach einer Vorschrift von G. PFLEIDERER und D. JECKEL (1) her, die die Angaben von KUBOWITZ und OTT (9) verbessert.
- Y) Kaninchenskelettmuskel-LDH von BOEHRINGER u. Söhnen, reinst und kristallisiert, dargestellt nach einer Vorschrift von BEISENHERZ et al. (10).
- 6) Rattenherz-LDH wurde nach der Vorschrift von Th. WIELAND, G. PFLEIDERER und F. ORTANDERL (13) kristallisiert erhalten.

Sie wurde anschließend präparativ mit Hilfe der Hochspannungselektrophorese im Stärkeblock in ihre einzelnen Komponenten aufgetrennt. Die von Th. WIELAND, G. PFLEIDERER u. Mitarb. (14) (15) angegebene Technik sei im Folgenden wegen ihrer Kompliziertheit kurz geschildert. Weitergehende Einzelheiten finden sich in der angegebenen Literatur.

Das als Kristallsuspension aufbewahrte Enzym wurde 25 min bei 15.000 Touren und 0° C abzentrifugiert. Der Rückstand wurde mit dem Spatel in einen in Veronalpuffer eingeweichten Dialysierschlauch gebracht. Anschließend wurde 1 h 15 min gegen m/15 Veronalpuffer pH 8,4 dialysiert. Danach wurde die Lösung mit Stärke angerührt und in den fertigen Stärkeblock (hergestellt aus 250 g Stärke und Veronalpuffer) eingetragen. Nun wurde 4 Stunden lang die Spannung angelegt (25 V/cm). Danach wurde auf Filtrierpapier ein "Abklatsch" abgenommen und darauf die Lage der Aktivität tragenden Banden durch "Sprühtest" mit DPNH und BTS bestimmt (2) (das Papier wird mit einer Lösung folgender Zusammensetzung besprüht: 6 ml m/15 Phosphat-Puffer pH 7,2, 2 ml m/10 BTS in dem genannten Phosphat-Puffer, einige Körnchen DPNH; im UV-Licht erscheinen die Enzym tragenden Stellen des Papiers dunkel: das dort gebildete DPN zeigt keine Fluoreszenz). Es ergab sich folgendes Bild (Abb.1):

(+)



START



(-)

Abb.1. Auftrennung der RH-LDH mit Hilfe der Hochspannungselektrophorese im Stärkeblock. "Abklatsch", auf dem die eingezeichneten Banden durch "Sprühtest" sichtbar gemacht wurden.

Vor den Banden 1 - 4 wurden nun etwa 0,5 cm breite Gräben ausgehoben. Es wurde je ein Stückchen Folie eingelegt und der Graben mit gut gewaschenem Glaspulver ausgefüllt (s. Skizze)



Längsschnitt

Dann wurde wieder Spannung angelegt. Die Banden wanderten langsam in das Glaspulver ein, und nach 5 Stunden war in den Zwischenräumen keine Aktivität nachweisbar. Jede Glaspulvereinlage wurde auf einer Glasfritte mit je ca. 3 ml m/30 wäßriger NH_4HCO_3 -Lösung eluiert. Im Eluat der Banden 1 - 3 war noch Aktivität nachzuweisen. Schließlich wurden die 4 Fraktionen 10 Minuten lang bei 3.000 Touren zentrifugiert, bei 0°C 32 h gegen m/30 NH_4HCO_3 -Lösungen dialysiert und erneut 15 min lang bei 3.000 Touren zentrifugiert. Die Lösungen waren dann im wesentlichen klar.

3. Reinheitsgrad der Präparate.

Kriterien für die Reinheit der Enzyme waren:

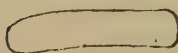
- 1.) Die Kristallisation. Alle untersuchten differenten LDHs waren kristallisiert. Daß dies ein nur ungenügendes Reinheitskriterium ist, zeigt das Beispiel der R_H -LDH, die ebenfalls kristallisiert vorlag, aber auf der Hochspannungselektrophorese 5 Banden aufwies (s. oben).
- 2.) Die Einheitlichkeit auf der Hochspannungselektrophorese. Diese bestand bei allen untersuchten LDHs. Die multiplen R-LDHs wurden mit Hilfe der Hochspannungselektrophorese getrennt, was einer elektrophoretischen Reinheitsprüfung entspricht. Was die differenten Enzyme angeht, vergl. man Arbeiten von G. PFLEIDERER (4) (13) (16).
- 3.) Die Einheitlichkeit auf der Niederspannungselektrophorese. Hier konnte man die differenten Enzyme auf Papier wandern lassen, was auf der Hochspannungselektrophorese nicht möglich ist. Nach einer Laufzeit von ca. 4 hs bei einer angelegten Spannung von 220 V und nach Anfärbung mit Amidoschwarz zeigte jedes Enzym eine scharfe Bande (Abb.2), die die Aktivität trug. Die R_H -Enzyme wurden aus praktischen und aus den unter 2.) aufgeführten Gründen nicht untersucht.
- 4.) Die in allen Fällen hohen Umsatzzahlen (verglichen mit den bisher erreichten). Dies gilt nur für die differenten Enzyme. Bei der Einzeldarstellung der

multiplen R_H -LDHs wurde aus technischen Gründen auf die Messung der Umsatzzahlen verzichtet. Die Umsatzzahlen waren bei:

R_S - LDH	68.000	(vgl. mit den in Tab. 1
S_H - LDH	43.000	(S. 4) angegebenen Li-
K_S - LDH	55.000	teraturwerten)
R_H - LDH	24.000	

(Mit R_H -LDH ist das kristallisierte Produkt gemeint, das noch alle 5 Komponenten enthält).

(+)



START



(-) S_H

R_S

K_S

Abb. 2. Niederspannungselektrophorese der differenten LDHs. Anfärbung mit Amidoschwarz.

c) Das Trypsin

- 1.) Aktivitätstest. Die Aktivität der Trypsinpräparate wurde nach dem KUNITZ-Test (7) bestimmt.

Technik: Man setzt eine Lösung an, die 0,02 mg Trypsin pro 1 ml H_2O enthält. Davon gibt man 0,05 ml = 1 Trypsin in ein Zentrifugenglas und füllt mit Effer (m/15 Phosphat-Puffer pH 8 oder Trispuffer) auf 1 ml auf. Dazu gibt man 1 ml einer 1 %igen Caseinlösung (durch 5minütiges Erhitzen auf $100^\circ C$ in Trispuffer hergestellt; die Lösung klärt sich beim Abkühlen fast vollständig). Eine halbe Stunde Reaktionszeit bei $37^\circ C$. Danach Zusatz von 3 ml 5 %iger Trichloressigsäure, eine halbe Stunde bei Raumtemperatur stehen lassen. Dann wird das ausgefallene Eiweiß bei 3.000 Touren abzentrifugiert, und

der Überstand wird im Photometer Eppendorf gemessen. Ansätze mit aktiven Trypsin-Präparaten zeigen bei 280 m μ ein je nach Aktivität mehr oder minder hohes Maximum der Extinktion, das der Peptidfraktion entspricht. Die Ergebnisse des Tests wurden nur qualitativ ausgewertet.

- 2.) Elektrophoretische Prüfung auf Reinheit und Versuch einer elektrophoretischen Reinigung. Die Beschaffenheit des Trypsins war für die angestellten Experimente von großer Wichtigkeit. Im Handel erhältliches kristallisiertes "reinstes" Trypsin (BOEHRINGER u. Söhne) enthält bekanntlich neben anderen Verunreinigungen* noch Beimengungen von Chymotrypsin, welches Peptidbindungen nicht in der spezifischen Weise des Trypsins spaltet. Um genau reproduzierbare Ergebnisse zu bekommen, mußte also versucht werden, das Handelspräparat weiter zu reinigen. GRASSMANN, HANNIG und SCHLEYER ist es gelungen, auf der präparativen kontinuierlichen Elektrophorese Trypsin von Chymotrypsin und anderen Nebenprodukten zu trennen und ein aktiveres Präparat als zuvor zu erhalten (18). Wir ließen entsprechend ein älteres Trypsinpräparat und ganz frisches Trypsin im Stärkeblock laufen (Puffer: 300 ml Pyridin, 20 ml Eisessig, Wasser auf 1 l). Der "Abblatsch" zeigte bei dem alten Präparat mehrere deutlich ausgeprägte Banden, darunter eine stark kathodisch wandernde Hauptbande, die entsprechend der GRASSMANN'schen Arbeit wahrscheinlich die Trypsinaktivität trug (s. Abb.3). Das frische Trypsin zeigte nur diese eine Bande. Schon auf der GRASSMANN'schen Elektrophorese waren die Trypsin- und Chymotrypsinaktivitäten zwar klar getrennt, aber nicht weit auseinander gezogen. Die Bande des Trypsins im Stärkeblock war so breit, daß in ihr möglicherweise Chymotrypsin mit

* nach mündlicher Mitteilung von Prof. P. GRABAR (Institut Pasteur, 1962) lassen sich kristallisierte Trypsinpräparate mit Hilfe der Immunelektrophorese in nicht weniger als 18 immunologisch verschieden sich verhaltende Fraktionen aufspalten.

hätte enthalten sein können. Wir ließen deshalb Chymotrypsin parallel laufen. Es blieb deutlich hinter dem Trypsin zurück. (s. Abb. 4)

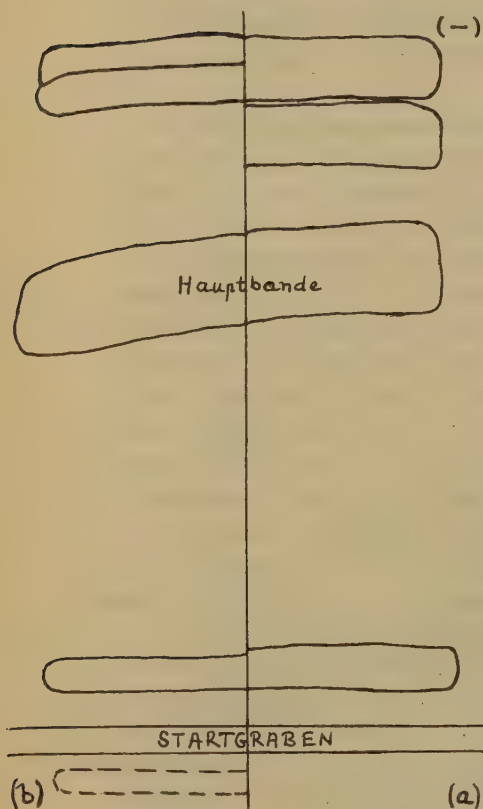


Abb.3. Hochspannungselektrophorese eines älteren Trypsinpräparates im Stärkeblock. Abklatsch, auf dem die eingezeichneten Banden durch Anfärbung mit Ninhydrin (a) bzw. Amidoschwarz (b) sichtbar gemacht wurden.

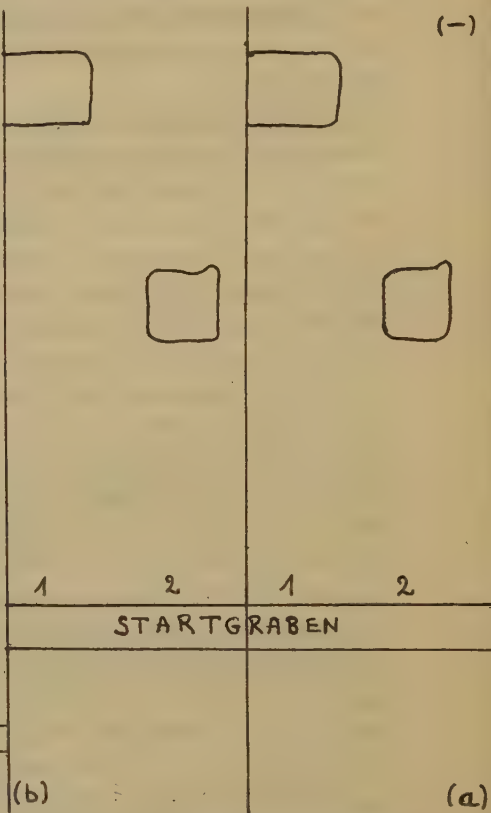


Abb.4. Hochspannungselektrophorese eines frischen Trypsinpräparates (1) und von Chymotrypsin (2) im Stärkeblock. Anfärbung der Banden wie in Abb.3.

Da die Empfindlichkeit des Nachweises von Eiweiß im Stärkeblock mit Hilfe des Abklatsches zu wünschen übrig läßt, versuchten wir trotz des Auffindens von nur einer Bande durch deren Elution aus dem Stärkeblock ein evtl. reineres Präparat als das eingesetzte zu erhalten. Zu diesem Zweck wurde nach der Waschlösung

vermethode" (s. Seite 7) vor der Hauptbande ein Graben ausgehoben und mit Folie und Glaspulver versehen. Ebenso wurde der Hinterrand der Bande durch Folie abgesichert. Nach dem Anlegen der Spannung wanderte das Trypsin in das Glaspulver ein und wurde anschließend eluiert und gefriergetrocknet. Das so gewonnene Protein zeigte aber keine ausreichende Trypsinaktivität mehr.

- b) Reinigung durch Inkubation in n/16 Salzsäure. Durch 24stündige Inkubation in n/16 HCl bei 57° C können Trypsinpräparate von restlicher Chymotrypsinaktivität befreit werden. Die so gewonnene 1 %ige Trypsinlösung wurde bei 0° C aufbewahrt. Sie war wochenlang ohne merklichen Aktivitätsverlust haltbar. Diese Methode ist in der Literatur schon mehrfach erwähnt worden (19) (20) (21).

Nach längerer Zeit zeigte die Trypsinlösung auf dem Pherogramm (pH 6,5) eine Anzahl Ninhydrin-positiver Banden. Um sie sichtbar zu machen, mußten aber sehr große Mengen Trypsin (im Vergleich zu den später benutzten: 0,6 mg gegenüber 0,01 - 0,02 mg auf 2,5 cm Papierbreite) aufgetragen werden, und auch dann waren die Banden sehr schwach. Auch Nullproben, die später mitliefen, zeigten, daß das verwandte Trypsin nicht Ursache von Störeffekten war.

C. Die tryptischen Verdauungen.

- a) Allgemeine Versuchsbedingungen. Es haben sich für die tryptischen Verdauungen bestimmte Versuchsbedingungen eingebürgert. Als Puffer wurde eine wäßrige m/30 NH_4HCO_3 -Lösung benutzt, um später beim Gefrier Trocknen keine Salzurückstände zu erhalten. In je 1 ml des Puffers befanden sich je ca. 2 mg Substratprotein, es wurden jeweils 1 % - 2 % Trypsin, bezogen auf das Substrat, zugesetzt, meistens in 2 Portionen. Der pH-Wert wurde in jedem Ansatz kurz vor Zugabe des Trypsins mit Hilfe von Ammoniak und Essigsäure mit der Glaselektrode auf den gewünschten Wert eingestellt; d.h., da das pH-Optimum des Trypsins zwischen pH 7,8 und pH 8,7 liegt, (22), auf pH 8,0 oder 8,2. Dieser verhältnismäßig niedrige Wert wurde gewählt, weil im Laufe

der Verdauung die H-Ionenkonzentration etwas abnimmt - höchstens um pH 0,2 - und man so auf jeden Fall im Bereich hoher Trypsinaktivität bleibt; auf diese Weise läßt es sich vermeiden, Autotritatoren zu benutzen, was bei jeweils 4 - 5 Ansätzen einen erheblichen apparativen Aufwand bedeutete.

- b) Dauer der Verdauungen. Das Fortschreiten der tryptischen Verdauungen kann man sehr gut anhand der Peptidmuster beurteilen, die man durch elektrophoretische Trennung der entstandenen Peptide erhält (s. Seite 18). Je weiter die Spaltung fortschreitet, desto klarer werden die Bilder, es bilden sich scharfe Banden aus, die sich schließlich nicht mehr verändern. Auf diese Weise wurde festgestellt, daß die Spaltungen im allgemeinen schon nach 4 - 5 Stunden beendet waren. Um mit Sicherheit Fehler auszuschließen, machten wir es uns zur Regel, die Ansätze 22 Stunden bei 37° C aufzubewahren, wobei etwa alle 15 Minuten umgeschüttelt wurde.
- c) Aufarbeitung der Hydrolysate. Am Ende der Verdauung wurde 5 Minuten auf 100° C erhitzt, um die Trypsinaktivität zu vernichten, und die Ansätze wurden der Gefriertrocknung unterworfen. Die Rückstände wurden in etwas Wasser aufgenommen und im für die weitere Verarbeitung notwendigen Maße konzentriert; etwa so, daß auf 0,01 ml 1 mg (eingesetztes) Eiweiß kam.
- d) Das Problem der Denaturierung. Bekanntlich spaltet Trypsin nur denaturierte Eiweiße. Es zeigte sich im Laufe der Versuche, daß einerseits der Verlauf einer tryptischen Verdauung sehr von der Art der Denaturierung abhängt, andererseits das Verhalten verschiedener Eiweiße gegenüber den gleichen Denaturierungsmitteln verschieden ist. Es wurden zunächst Vorversuche mit Serumalbumin unternommen. Die Präparate stammten von Rind, Pferd und Mensch. In einfacher Weise erreicht man die Denaturierung von Eiweißkörpern durch Erhitzen. Dementsprechend wurden die Serumalbumine vor der tryptischen Spaltung 5 Minuten auf 100° C gebracht. Die Lösungen schäumten etwas, blieben aber fast völlig klar. Derartig denaturiertes Serumalbumin ließ sich mit Trypsin glatt verdauen, und es ergaben sich auf der Hochspannungselektrophorese sehr schöne Peptid-

muster (s. Abb.5); die Technik der Auftrennung wird weiter unten (Seite 18) geschildert. Als Nebebefund ergab sich, daß die Muster der 3 Albumine sich sehr deutlich von einander unterscheiden, also offenbar verschiedene Primärstruktur vorliegt. Dieser Befund ist schon an anderer Stelle erhoben worden, z.B. bei Endgruppenbestimmungen (23). Der Versuch, auch bei den Enzympräparaten die Hitze-denaturierung anzuwenden, stieß auf Schwierigkeiten. Nur die Herz-LDHs zeigten ein den Serumalbuminen analoges Verhalten. Die aus Skelettmuskel gewonnen Enzyme flockten beim Erhitzen aus*. Das ausgeflockte Eiweiß wurde von Trypsin nicht sehr gut angegriffen, besonders schlecht die hitze-denaturierte K_3 -LDH.

Eine für die tryptische Verdauung sehr gut geeignete Form der Denaturierung des Substrats fand sich schließlich in der Kombination von Harnstoff- und Hitze-denaturierung. Die Harnstoffdenaturierung ist sehr schonend. Der Harnstoff löst wahrscheinlich die Wasserstoffbrücken im Eiweiß und entfaltet dadurch die Aminosäurenketten (24).

Die Denaturierung wurde in folgender Form durchgeführt:

1. Inkubation des in Phosphatpuffer pH 7,2 suspendierten Enzyms in 4 m wäßriger Harnstofflösung. Dauer 90 Minuten.
2. Dialyse gegen m/30 NH_4HCO_3 -Puffer pH 8,0. Dauer 12 Stunden.
3. Erhitzen auf $100^{\circ}C$ im Wasserbad. Dauer 5 Minuten.

Danach wurde, wie unter a) beschrieben, der pH-Wert eingestellt und die Verdauung begonnen.

Nur die R_{II} -Enzyme wurden aus technischen Gründen der einfachen Hitzedenaturierung unterzogen. Wie oben erwähnt, bleiben sie wie alle bisher untersuchten Herz-LDHs, dabei in Lösung und werden von Trypsin glatt gespalten.

Über eine Denaturierung durch Einwirkung von Säure, die bei einer R_{II} -LDH-Aufarbeitung aus technischen Gründen angewandt wurde, s. Seite

Dieses unterschiedliche Verhalten wäre durchaus weiterer Untersuchung wert.

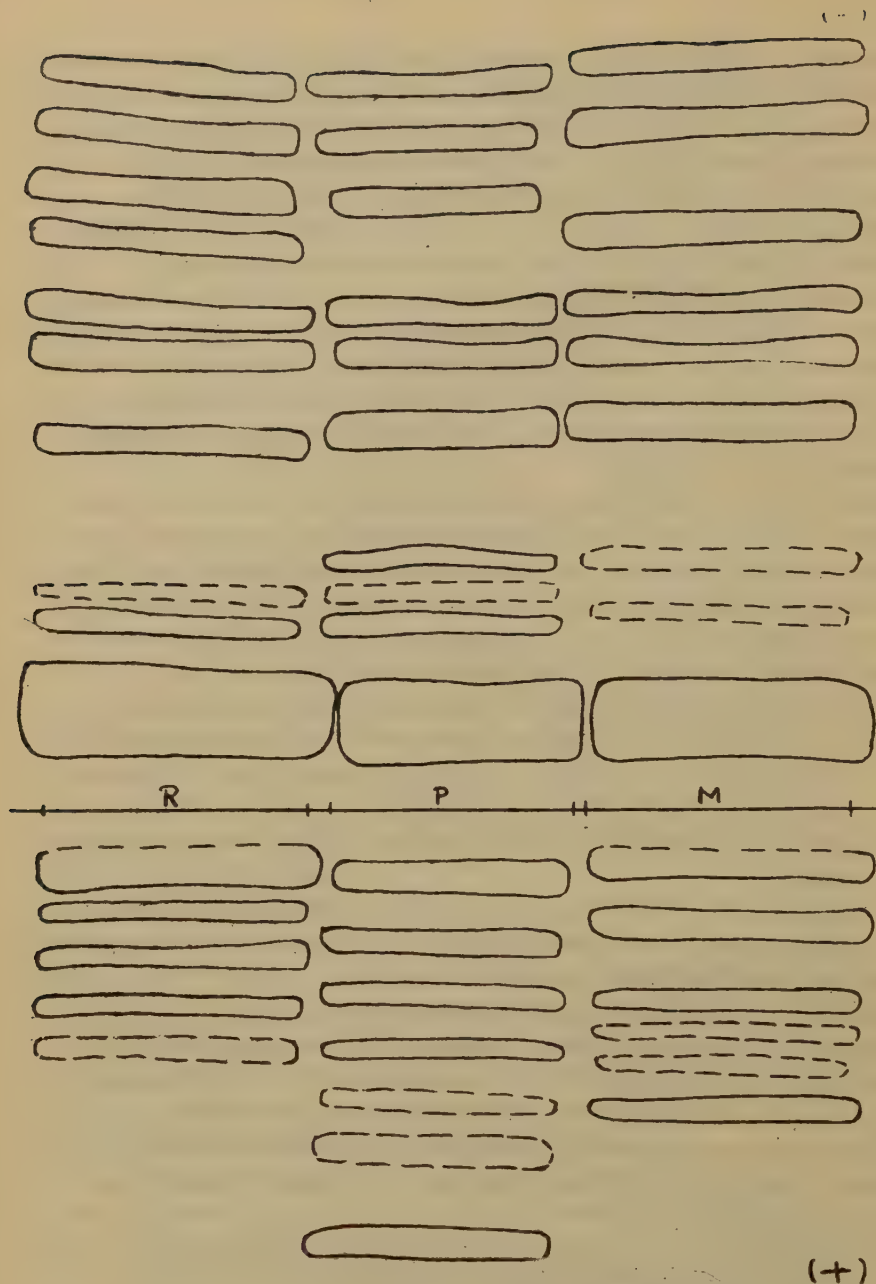


Abb. 5. Peptidmuster der tryptisch abgebauten Serumalbumine vom Rind (R), Pferd (P) und Menschen (M), erhalten durch Hochspannungselektrophorese bei pH 6,5. Anfärbung mit Ninhydrin.

D. Vergleich der tryptischen Spaltprodukte.

Um die tryptischen Spaltprodukte vergleichen zu können, mußten sie möglichst anschaulich dargestellt werden. Von Anfang an kamen hierfür die modernen Methoden der Chromatographie und der Hochspannungselektrophorese in Betracht. Die zur Auswahl der Methode notwendigen Vorversuche wurden meist mit den tryptischen Spaltprodukten der Serumalbumine durchgeführt.

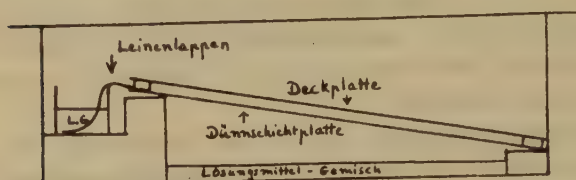
a) Eindimensionale Auftrennung.

1. Papierchromatographie. Versuche mit verschiedenen Lösungsmittelgemischen zeigten, daß die Auftrennung der Hydrolysate im Vergleich mit den im Folgenden angeführten Methoden nur sehr unzureichend erfolgte, sowohl hinsichtlich der Zahl der erhaltenen Banden als auch bezüglich deren Schärfe.
2. Dünnschichtchromatographie. Die in der Hauptsache von STAHL und Mitarb. (25) entwickelte Dünnschichtchromatographie erwies sich als viel besser geeignet. Die Qualität der erhaltenen Trennungen war so bestechend, und die Trennungen können so einfach und zuverlässig durchgeführt werden, daß die Methode ganz allgemein zur Analyse von Peptidgemischen zu empfehlen zu sein scheint. Bemerkenswert ist die außerordentliche Empfindlichkeit der Methode. Selbst Gammamengen von Substanzen können ohne weiteres nachgewiesen werden. Es wurde mit einer Silicagel-Gips-Schicht (26) von 0,2 mm Stärke auf Glasplatten des Formats 20 x 20 cm gearbeitet, und eine Reihe von Lösungsmittelgemischen wurde auf ihre Eignung zur Trennung von Peptidgemischen der vorliegenden Art und von Gemischen synthetischer Peptide getestet. Dabei ergab sich Folgendes (Tab.2):

Geeignet	Bedingt geeignet	Ungeeignet
Lösungsmittelgemisch, M: Pyridin / Eisessig / n-Butanol / H ₂ O (20 : 6 : 34 : 30)	n-Propanol / Wasser (70:30)	Collidin wassergesättigt Collidin / Lutidin (1:1)
n-Butanol / Eisessig / Wasser (3 : 1 : 1)		Gemische mit Isoamyl- alkohol
Phenol wassergesättigt		Methyläthylketon / Pyridin / H ₂ O (70 : 15 : 15)

Tab.2. Eignung verschiedener typischer Lösungsmittelgemische zur Trennung von Peptiden.

Um den Vorgang der Auftrennung zu beschleunigen, wurden die Glasplatten mit der Trägerschicht nicht, wie bisher üblich, senkrecht in eine Schale mit dem Lösungsmittelgemisch gestellt, sondern sie wurden etwas gegen die Horizontale geneigt, und der Zufluß erfolgte an der oberen Kante über einen Leinenlappen, der in einen Trog mit dem Lösungsmittelgemisch tauchte. Die Skizze gibt das Prinzip der Anordnung wieder.



Die Neigung der Platte muß so gewählt werden, daß das Lösungsmittelgemisch nicht über die Trägerschicht hinweg abläuft; sie hängt also ab sowohl vom verwendeten Lösungsmittelgemisch als auch von der Art und Dicke der Trägerschicht. Die Abb. 6 zeigt die Auftrennung einiger Hydrolysate mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie.

3. Hochspannungselektrophorese. Ebenfalls ausgezeichnete Resultate brachte die Hochspannungselektrophorese auf Papier nach WIELAND und PFLEIDERER (27)(15). Der von allen untersuchten Puffern am besten geeignete war ein Gemisch aus Pyridin, und Eisessig und Wasser (50 : 5 : 445) mit einem pH von 6,5. Bei niedrigerem pH sind die Banden unschärfer. Die Elektrophorese erfolgte auf Papier von MACHEREY und NAGEL Nr. 214 oder 2214, sie wurde bei 50 V/cm 1,5 Stunden lang durchgeführt. Die jeweils aufgetragene Substanzmenge lag bei 1 mg (errechnet aus der eingesetzten Proteinmenge) auf 2,5 cm Papierbreite. Die Banden wurden dann in folgender Weise sichtbar gemacht: Zuerst wurde in üblicher Art mit Minkhyaron entwickelt, und die erkennbaren Banden wurden eingezeichnet. Anschließend wurde mit diazotierter Sulfacil-

säure (PAULYs Reagenz) entwickelt (28) und die damit angefärbten Banden wurden ebenfalls vermerkt. Mit dieser Methode wurden so hervorragende Bilder der Peptidmuster erzielt, daß wir sie für die Durchführung der Untersuchungen auswählten. Um die Klarheit der Bilder zu verdeutlichen, zeigt Abb. 7 die Photographie eines mit Ninhydrin entwickelten Pherogramms, auf dem die tryptischen Abbauprodukte dreier LDHs aufgetrennt wurden. Die Bilder ließen sich für dieselben Peptidgemische ohne weiteres reproduzieren. Nur bei sehr schwach ausgeprägten Banden können, wenn nicht jeweils gleiche Menge Substanz aufgetragen wird, Zweifel entstehen.

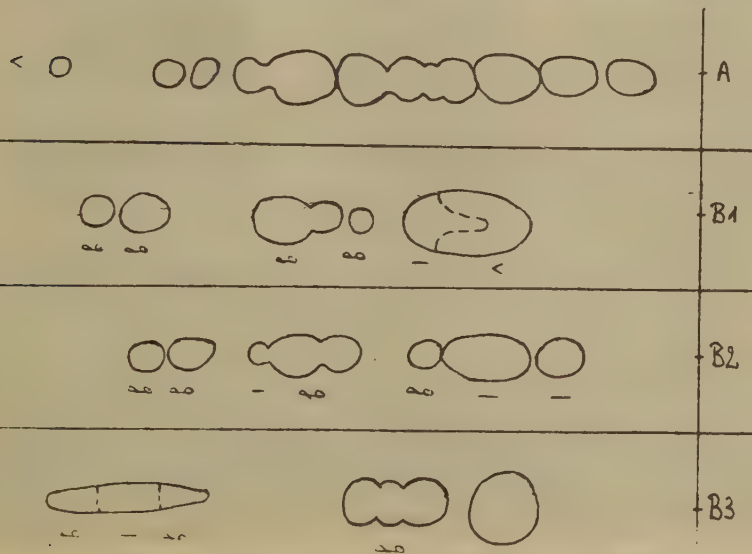


Abb.6. Auftrennung von Peptidgemischen durch Dünnschichtchromatographie. A. tryptische Abbauprodukte der R_S-LDH; Lösungsmittelgemisch "M" (s.Tab.2); Laufzeit 11 Std.; absteigend. B. Gemisch von 8 synthetischen Peptiden. 1. Lösungsmittelgemisch "M"; Laufzeit 11 Std.; absteigend. 2. n-Butanol/Eisessig/Wasser (s.Tab.2); Laufzeit 9,5 Std., absteigend. 3. Phenolum liquidum; Laufzeit 10,5 Std.; aufsteigend. Anfärbung durch Ninhydrin, g = gelb, v = violett, l = lila, nat.Gr.



Abb.7. Photographie eines mit Ninhydrin
angefärbten Pherogrammes, das die Peptid-
muster dreier tryptisch abgebauter LDHs
zeigt.

b) Ein- oder zweidimensionale Auftrennung?

Hydrolysate der vorliegenden Art trennt man am feinsten auf, wenn man sie nacheinander in 2 Richtungen auseinander zieht, also zweidimensional arbeitet. Dabei kann in 2 Richtungen chromatographiert oder elektrophoriert, oder auch nacheinander elektrophoriert und chromatographiert werden. Der Versuch, solche zweidimensionalen Trennungen durchzuführen, stieß auf erhebliche Schwierigkeiten. Die Dünnschichtchromatographie scheint dafür überhaupt wenig geeignet zu sein. Die Trägerschicht verträgt zweimalige Behandlung mit Lösungsmittelgemischen nicht. Es wurde dann versucht, zweidimensional sowohl mit Chromatographie plus Elektrophorese als auch mit Hilfe von doppelter Elektrophorese auf Papier zu arbeiten. In beiden Fällen zeigte es sich, daß dazu eine sehr eingehende Ausarbeitung der Technik notwendig ist. Da weiterhin die Methode einen erheblichen Nachteil hat, nämlich den, daß man keine Proben auf dem gleichen Papier parallel laufen lassen kann, wurde beschlossen zu prüfen, ob man nicht schon mit eindimensionaler Trennung Unterschiede der zu vergleichenden Peptidmuster würde feststellen können. Das bedeutet: Die in dieser Arbeit aufgeworfene Frage nach Unterschieden in der Primärstruktur der vorliegenden homotropen Enzyme ließ sich mit Hilfe der gewählten Methodik beantworten, wenn sich Unterschiede im Peptidmuster der gespaltenen Enzyme ergeben sollten; ließen sich solche nicht auffinden, so konnte die Frage nicht beantwortet werden, und es mußten feinere Methoden entwickelt werden.

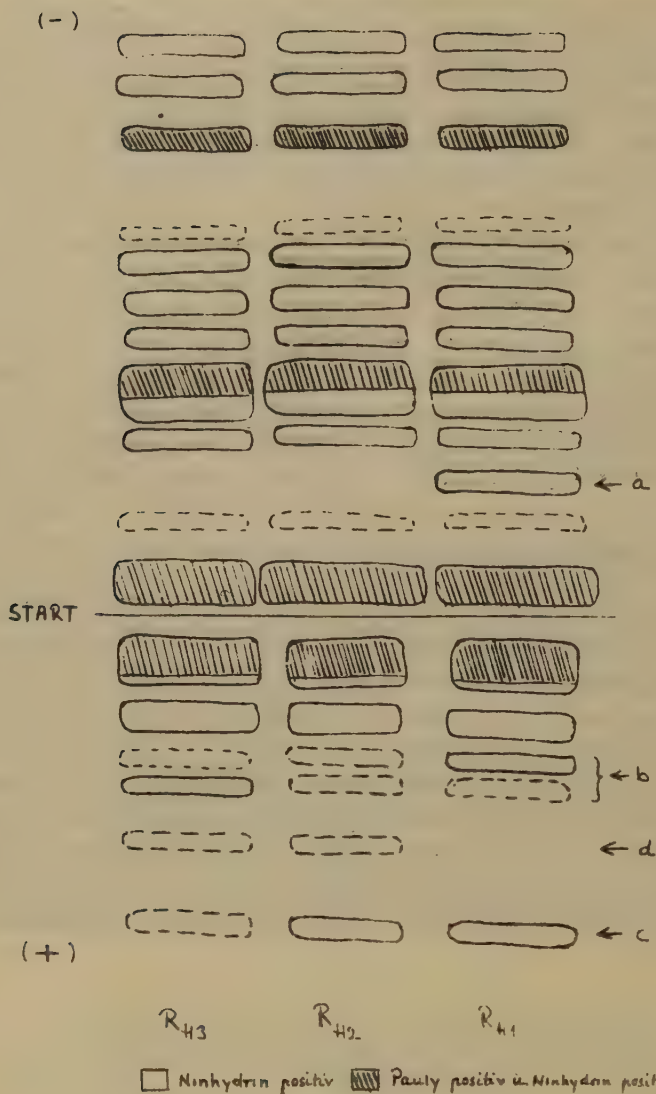


Abb. 8. Pherogramm der tryptischen Spaltprodukte von 3 multiplen R.-LDHs (R_{H1} - R_{H3}) bei pH 6,5. Anfärbung mit Ninhydrin und PAULY's Reagenz. Nat.Gr. Bezeichnungen s. Text.

3. Experimente und Ergebnisse

Es wurden zunächst mehrmals die relativ leicht verfügbaren Enzyme aus Kaninchenskelettmuskel, Rattenskelettmuskel und Schweineherz nebeneinander tryptisch abgebaut, und die Peptidmuster wurden verglichen. Die Bilder waren schließlich gut reproduzierbar.

Als nächstes wurde in einer großen Aufarbeitung aus ca. 50 Rattenherzen das Rattenherzenzym dargestellt und anschließend elektrophoretisch in seine 5 Komponenten aufgeteilt. Nach der tryptischen Spaltung der Komponenten I, II und III (von Komponente IV und V lag für die Spaltung zu wenig Substanz vor) zeigte das Pherogramm die in Abb. 8 angegebenen Peptidmuster, die also den Vergleich multipler Herz-LDHs bezüglich ihrer Primärstruktur ermöglichen. Die vor allem in qualitativer Hinsicht sehr weitgehende Übereinstimmung der komplizierten Peptidmuster ist ein guter Beweis für die Sauberkeit der Methode. Arbeitete diese nämlich unexakt, so wäre es außerordentlich unwahrscheinlich, daß 4 getrennt voneinander aufgearbeitete Ansätze zu einem weitgehend gleichen, so außerordentlich spezifischen Resultat führten.

Um die in Abb. 8 bei a, b und c aufgefundenen Unterschiede zu überprüfen, wurden noch ein weiteres Mal die Komponenten I, II und III (von den Komponenten IV und V konnten wir auch diesmal trotz größter Mühe nur ungenügende Mengen aus dem Stärkeblock eluieren) der R_H -LDH dargestellt (Aufarbeitung aus 70 Rattenherzen). Um bei der Elution aus dem Stärkeblock möglichst alles Eiweiß zu erfassen, legten wir diesmal keinen Wert auf schonende Denaturierung, sondern eluierten die Enzymbanden mit Wasser und anschließend mit 0,4 n Natronlauge und fällten aus den Eluatzen das Eiweiß mit 6 n Salzsäure bzw. 10 %iger Trichloressigsäure aus. Das ausgeflockte Eiweiß wurde nach 12 Stunden abzentrifugiert, einige Male zuerst mit 10 %iger Trichloressigsäure, dann mit Alkohol und Aceton gewaschen und schließlich getrocknet.

Es lagen also die Komponenten I, II und III der R_H -LDH in denaturierter Form als Pulver vor.

Zur Verdauung wurden die Eiweiße zunächst in 0,4 n Natronlauge gelöst (was nur mit Hilfe eines Homogenisators gelingt) und die Lösungen dann gegen $m/30 \text{ NH}_4\text{HCO}_3$ -Lösung dialysiert. Darauf folgte die tryptische Spaltung in üblicher Weise; sie ging

glatt vonstatten.

Die aus diesem Experiment erhaltenen Peptidmuster glichen denen aus Abb. 8 vollständig bis auf den Unterschied bei a, der nicht reproduziert werden konnte und bis auf eine schwache Bande (d in Abb. 8), die wir bei Komponente II und III entdeckten und die Komponente I nicht aufwies.

Als Ergebnis des Vergleichs der tryptischen Abbauprodukte von 3 multiplen Herz-LDHs ergibt sich also, daß die Peptidmuster sicher quantitative, möglicherweise auch qualitative Unterschiede aufweisen. Es muß beachtet werden, daß quantitativen Unterschieden auf den Pherogrammen qualitativ unterschiedliche Zusammensetzungen der Hydrolysate zugrunde liegen kann, da, wie oben erwähnt, die Banden der Pherogramme in den meisten Fällen aus mehreren Peptiden bestehen.

Die Abbildungen 9, 10 und 11^{*} lassen den Vergleich der Primärstruktur verschiedener differenter LDHs zu, und zwar, wie auf Seite 3 gefordert, den von LDHs aus gleichen Organen verschiedener Tiere (Abb. 9 und 10) und den von LDHs verschiedener Organe desselben Tieres (Abb. 11). Sie beruhen auf Originalpherogrammen, auf denen die jeweiligen Hydrolysate nebeneinander aufgetrennt wurden. In allen Abbildungen läßt sich an den vermerkten Stellen unterschiedliche Primärstruktur der untersuchten Enzymproteine erkennen.

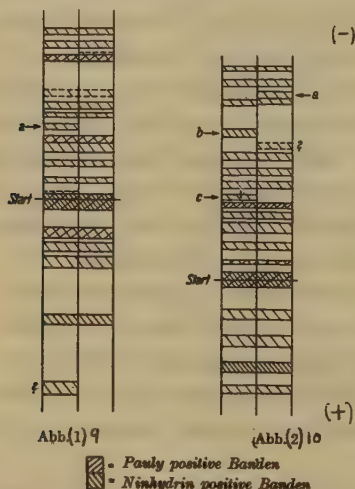


Abb. (1) Pherogramme der tryptischen Spaltpeptide von LDH aus Rattenherz (links) und Schweineherz (rechts) bei pH 6,5. Die Dichte der Schraffur deutet Intensität der Farbreaktion an. Abb. (2) Pherogramme der tryptischen Spaltpeptide von LDH aus Kaninchenskelettmuskel (links) und Rattenskelettmuskel (rechts) bei pH 6,5. Erklärung wie bei Abb. 1.

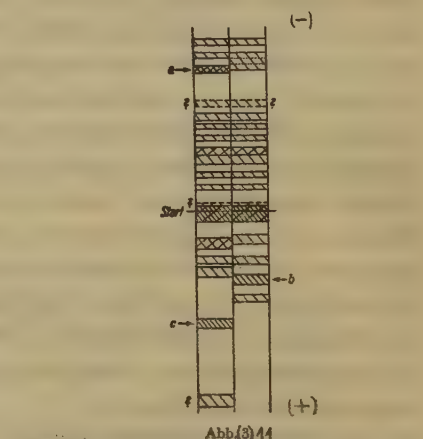


Abb. (3) Pherogramme der tryptischen Spaltpeptide von LDH-Komponente I aus Rattenherz (links) und aus Rattenskelettmuskel (rechts) bei pH 6,5. Erklärung wie bei Abb. 1.

* Die Abb. 9, 10 und 11 sind einer Arbeit von Th. WIELAND, G. PFLEIDERER und K. RAJEWSKY (29) entnommen, in der die hier dargestellten Ergebnisse kurz mitgeteilt wurden.

4. Besprechung der Ergebnisse

Die Frage, zu deren Beantwortung die vorliegende Arbeit durchgeführt wurde, lautete: Weisen 7 homotrope Enzyme - LDHs teils differenter, teils multipler Art - Unterschiede in ihrer Primärstruktur auf? Es zeigt sich, daß die Methodik, die ausgearbeitet wurde, zur Beantwortung dieser Frage geeignet ist. Denn sie erlaubt die Aussage, daß alle untersuchten Enzyme unterschiedliche Primärstruktur besitzen. Zwischen den Peptidmustern der multiplen R_H -LDHs konnten sichere quantitative Unterschiede festgestellt, qualitative wahrscheinlich gemacht werden. Die Peptidmuster der differenten Enzyme waren alle qualitativ verschieden.

Dieses Ergebnis wurde inzwischen durch eine Arbeit von Th. WIELAND, G. PFLEIDERER und L. RETTIG bestätigt und ergänzt: Aminosäureanalysen der hier untersuchten LDHs, auch der multiplen, erbrachten klare Unterschiede zwischen allen (30). Die Unterschiede der Peptidmuster mögen geringfügig erscheinen; eine einfache Überlegung zeigt, was sie zu bedeuten haben: Kennt man den Gehalt eines Eiweißkörpers an Lysin und Arginin, so weiß man auch, in wieviele Bruchstücke er durch Trypsin zerlegt wird. (Vergl. Wirkungsweise des Trypsins S. 5). Nach den oben angeführten Aminosäureanalysen der LDHs enthält die Komponente I der R_H -LDH im Molekül 89 Lysin- und 31 Argininmoleküle und die übrigen LDHs weichen größenordnungsmäßig nicht davon ab. Das bedeutet, daß das Trypsin dieses Enzymprotein in 121 Peptide zerlegen müßte. Nun zeigt das Pherogramm der Peptide der R_H -LDH außer der Bande der am Start liegegebliebenen neutralen Peptide 18 Banden, d.h., daß diese Banden im Durchschnitt aus mehreren Peptiden bestehen werden, selbst wenn wir annehmen, daß der größte Teil der entstehenden Peptide elektroneutral ist. Aus unseren Pherogrammen herauszulesende Unterschiede werden also in den meisten Fällen Zeugnisse eines erheblichen Unterschiedes der Aminosäuresequenz der verglichenen Eiweißkörper sein.

Auf der anderen Seite kann schon ein Unterschied der Aminosäuresequenz an einer einzigen Stelle im Pherogramm Abweichungen an zwei Stellen hervorrufen, dann nämlich, wenn die beiden unterschiedlichen Peptide im elektrischen Feld verschiedene Wanderungsgeschwindigkeiten haben, und diese von denen der übrigen Peptide deutlich abweichen. Dieser Fall wird eher

selten auftreten.

Zusammenfassend läßt sich also sagen, daß die beobachteten Unterschiede der Peptidmuster keinen sicheren Schluß auf den Umfang der ihnen zugrunde liegenden Unterschiede der Aminosäuresequenz der betreffenden Eiweißkörper erlauben. Im allgemeinen werden die Unterschiede erheblich sein. Um sichere Aussagen machen zu können, müßten die Peptide noch feiner differenziert werden, z.B. durch zweidimensionale Auftrennung (vergl. Seite 21).

Daß übrigens schon kleinste Unterschiede der Primärstruktur Eiweißkörper zu verschiedenem Verhalten im elektrischen Feld veranlassen können, hat INGRAM (31) (32) gezeigt, der durch Vergleich der Peptidmuster nachwies, daß sich die elektrophoretisch vom normalen Hämoglobin A abtrennbaren Hämoglobine C und S von jenem nur jeweils in einer einzigen Aminosäure unterscheiden.

Durch die vorliegende Arbeit wurde also nachgewiesen, daß in einem Organismus, ja selbst in einem Organ Enzyme gleicher Funktion nebeneinander vorkommen, die unterschiedliche Primärstrukturen ihres Eiweißteils aufweisen.

Die Bedeutung dieser Befunde ist heute noch nicht recht abzusehen. Das erhebliche praktische Interesse, daß sie für die Medizin besitzen, wurde oben schon erwähnt (s. Seite 2). Vor allem aber werfen sie allgemein-biologische Probleme auf. Seit den grundlegenden Arbeiten von BUTENANDT und KÜHN (33) hat man von der Hierarchie im Stoffwechsel der Zelle eine einfache Vorstellung: Das Genmaterial ist verantwortlich für die Merkmalsausprägung der Zelle. Es kommt dieser Aufgabe nach, indem es zur Vermittlung seiner "Informationen" die Arbeit der Enzyme, und das heißt: auch deren Synthese, steuert. Jedes Enzym ist also von einem bestimmten Gen abhängig. Diese Hypothese ist von BEADLE (34) 1945 formuliert worden.

Es ist heute noch nicht einsichtig, wie und ob überhaupt die Entdeckung einer Vielfalt multipler und differenter Enzyme innerhalb eines Organismus unter diese Vorstellung subsumiert werden kann.

Für das Auftreten differenter Enzyme innerhalb eines Organismus bieten sich gewisse Ansatzpunkte zum Verständnis an. Zwar hat nach unserer Vorstellung jede Zelle des Organismus identisches

Genmaterial; doch kommt es im Laufe der Entwicklung des Individuums zu einer Differenzierung der Zellen, ein Vorgang, zu dessen Erklärung nichts übrig bleibt als anzunehmen, daß in den Zellen bestimmte, spezifische Teile des Genmaterials aus dem Stoffwechsel ausgeschaltet bleiben, so daß ein jeweils organspezifisches, in Funktion befindliches "Genmuster" übrigbleibt. Eine solche "Stille-gung" von Genen könnte durch Dehydratation zustande kommen (35). Die Unterteilung der Gene in Operator- und Strukturgene durch die moderne Mikrobiologie und Genetik (37) (36) legt die Vorstellung nahe, daß die Operatorgene in spezifischer Weise bestimmte Teile der Erbsubstanz, Strukturgene, in Funktion setzen und andere nicht. Mit diesen Vorstellungen ließe sich das Auftreten organspezifischer homotroper Enzyme vereinbaren: Man könnte annehmen, daß zunächst in allen Zellen gleiche homotrope Enzyme gebildet werden, von denen dann im Laufe der Differenzierung eines oder mehrere organ-spezifisch ausgewählt werden; tatsächlich haben PFLEIDERER und WACHSMUTH (38) zeigen können, daß in der Ontogenese des Menschen zunächst alle Zellen ein relativ einheitliches LDH-Muster zeigen (5 Banden mit Betonung der dritten), das sich dann mit der Differen-zierung des Organismus selbst differenziert und in die späteren organtypischen Muster übergeht; und ebenfalls PFLEIDERER und Mitarb; haben in mehreren Arbeiten (2) (38) dargelegt, daß auch beim Er-wachsenen - und entsprechend bei vielen adulten Tieren, besonders der Ratte - in allen Organen mit Hilfe der Membranfolie 3 - 4 - 5 LDHs nachzuweisen sind, wenn auch meist eine Bande quantitativ überwiegt. Es bietet sich damit, am Beispiel der LDHs entwickelt, eine einfache Hypothese an, die gleichzeitig das Auftreten diffe-renter und multipler Enzyme in einem Organismus in Einklang mit den grundlegenden Vorstellungen vom Stoffwechsel der Zelle er-klärt: Die Erbsubstanz besitzt "Informationen" für eine bestimmte Anzahl homotroper Enzyme. Im Laufe der Differenzierung wird die Bildung eines oder mehrerer von diesen in den sich herausbildenden Organparenchymzellen bevorzugt, so daß organtypische Enzymmuster entstehen.

Leider erklärt diese Hypothese neueste Befunde nicht in ausreichen-der Weise.

Zwar deckte die Elektrophorese in allen Organen der Ratte qualita-tiv sehr ähnliche Enzymmuster auf (2) (13), aber bei genauerer Unter-suchung scheinen an entsprechender Stelle dieses Musters gelegene

Enzyme aus verschiedenen Organen nicht mit einander identisch zu sein (2) (13). Auch weicht die Zahl der elektrophoretisch in den einzelnen Organen entdeckten Enzymbanden gerade bei Anwendung feinsten Techniken gelegentlich erheblich von der Zahl 5 ab, und zwar in beiden Richtungen.

Man könnte auch diese Befunde in die genannte Hypothese hineinpressen und annehmen, daß zwar die LDHs in der beschriebenen Weise gebildet, aber anschließend durch weitere organspezifische Mechanismen verändert wurden. Damit wäre aber der Akzent der gesamten Problematik entscheidend verschoben: der Punkt, an dem die Widersprüchlichkeit offen zu Tage zu treten schien, die in der Existenz einer einheitlichen Erbsubstanz auf der einen Seite und der uneinheitlichen von der Erbsubstanz abhängigen Homotropenenzyme auf der anderen liegt, dieser Punkt, an dem weitere Arbeit ansetzen konnte, war die Synthese dieser Enzyme durch die Erbsubstanz; diese verlieren wir jetzt ganz aus dem Blick; gleichgültig, ob ursprünglich mehrere Enzyme oder nur ein Enzym bestimmter Funktion gebildet wird: Die uns entgegentretende Fülle der homotropen Enzyme ist durch irgendwelche schwer faßbaren sekundär einwirkenden Mechanismen bedingt.

Es gibt heute noch keine sicheren Befunde, die in irgendeine Richtung deuten.

Nur von MARKERT (39) liegt eine Publikation vor, in der behauptet wird, die Komponente II der Rinderherz-LDH ließe sich durch Inkubation in 5 M Guanidinhydrochlorid in Untereinheiten mit einem Molekulargewicht von je 34.000 zerlegen; auf der Hochspannungselektrophorese ließen diese Untereinheiten 2 Typen verschiedener Ladung erkennen. Da die LDH ein Molekulargewicht von ca. 130.000 hat, würde das bedeuten, daß sie aus 4 solchen Untereinheiten bestünde; gibt es nun 2 verschiedene Arten von LDH-Untereinheiten, so ließen sich durch deren verschiedene Kombinationen zu Vierergruppen gerade 5 unterschiedlich gebaute Gesamt-moleküle denken, entsprechend den 5 LDH-Banden, die sich in den meisten Organextrakten finden. Der Befund von MARKERT legt also die Vorstellung nahe, daß die Erbsubstanz zunächst die Bildung mehrerer Untereinheiten der LDH veranlaßte, die dann organspezifisch zum Gesamt-molekül zusammengesetzt wurden.

Sollte es sich bei den von uns gefundenen quantitativen Unterschieden der Peptidmuster multipler P_{H} -LDHs tatsächlich um quantitative Unterschiede in der Peptidzusammensetzung der Hydro-

lysate handeln, so könnte dieser Befund die sich im Anschluß an MARKERT ergebende Vorstellung stützen. Zumindest beim Vergleich multipler LDHs wären dann nämlich in erster Linie quantitative Unterschiede in der Zusammensetzung der tryptischen Spaltprodukte zu erwarten.

Von G. PFLEIDERER und Mitarb. konnte der Befund von MARKERT bisher nicht bestätigt werden*.

* mündliche Mitteilung von Prof. PFLEIDERER

5. Zusammenfassung

Es wurden die tryptischen Spaltprodukte von Kaninchen- und Rattenskelettmuskel-Lactatdehydrogenase, Schweineherz-Lactatdehydrogenase und von 3 multiplen Rattenherz-Lactatdehydrogenasen miteinander verglichen.

Die ausgearbeitete Methodik wird eingehend geschildert.

Es zeigt sich, daß alle genannten differenten und multiplen Lactatdehydrogenasen verschiedene Primärstruktur besitzen.

Es wird damit erstmalig nachgewiesen, daß in einem Organismus und selbst in einzelnen Organen desselben Enzyme gleicher Funktion mit verschiedener Primärstruktur ihres Eiweißteils vorkommen können.

Das Ergebnis wird vor allem im Zusammenhang mit genetischen und entwicklungsphysiologischen Vorstellungen diskutiert.

Verzeichnis der Abkürzungen

LDH	Lactatdehydrogenase
S _H	Schweineherz
R _H	Rinderherz
R _H I - V	Rattenherz-LDH, Komponente I - V
K _S	Kaninchenskelettmuskel
R _S	Rattenskelettmuskel
DPN bzw. DPNH .	Diphosphopyridinnucleotid bzw. seine hydrierte Form
BTS	Brenztraubensäure

Herrn Prof. Dr. Th. WIELAND und Herrn Prof. Dr. G. PFLEIDERER möchte ich sehr herzlich dafür danken, daß sie mir die Möglichkeit gegeben haben, an ihrem Institut chemisches und besonders enzymologisches Arbeiten kennenzulernen; dies dazu an einem so fesselnden Gegenstand, wie es das Phänomen der Heterogenität von Enzymen darstellt. Ich habe ihnen weiterhin für eine Fülle von Hinweisen und Ratschlägen zu danken.

Den Mitarbeitern des Instituts bin ich sehr dankbar für die Freundlichkeit und Hilfsbereitschaft, die ich bei ihnen gefunden habe; ganz besonders Herrn Dr. L. RETTIG, der in selbstloser Weise bei der Darstellung der Rattenherzenzyme mitgearbeitet hat.

Literaturverzeichnis

1. O. WARBURG und W. CHRISTIAN: Biochem. Z. 314, 149 (1943)
2. Th. WIELAND, G. PFLEIDERER, I. HAUPT; W. WÖRNER:
Biochem. Z. 332, 1, (1959)
3. Th. WIELAND u. G. PFLEIDERER: Angew. Ch. 74, 261 (1962)
4. G. PFLEIDERER u. D. JECKEL: Biochem. Z. 329, 370 (1957)
5. R. RICHTERICH: Enzymopathologie, Springer-V., Berlin 1958
6. W. WÖRNER u. H. MARTIN: Klin. Wochenschrift, 39, 368 (1961)
7. A. AKESON u. H. THEORELL: Arch. Biochem. Biophysics 91, 319 (1960)
8. aus: F. LEUTHARDT, Lehrb. d. physiolog. Chemie
V. Walter de Gruyter, 1957, S. 197
9. F. KUBOWITZ u. P. OTT, Biochem. Z. 314, 94 (1943)
10. G. BEISENHERZ, H.J. BOLTZE, Th. BÜCHER, R. CZOK, K.H. GARBADE,
E. MEYER-ARENDT, G. PFLEIDERER: Z.f. Naturf. Band 86, Heft 10,
555 (1953)
11. T.E. WEICHSELBAUM: Amer. J. Clin. Path., Technic Soc.
10, 40 (1946)
12. F.B. STRAUB: Biochem. J. 34, 483 (1940)
13. Th. WIELAND, G. PFLEIDERER u. F. ORTÄNDERL: Biochem. Z. 331, 103
(1946)
14. Th. WIELAND, G. PFLEIDERER u. L. RETTIG: Biochem. Z.
70, 341 (1958)
15. Th. WIELAND u. G. PFLEIDERER: Angew. Chemie 69, 199 (1957)
16. Th. WIELAND u. G. PFLEIDERER: Biochem.: 329, 112 (1957)
17. KUNITZ: J. Gen. Physiol. 30, 291 (1947)
18. GRASSMANN, HANNIG u. SCHLEYER: Z. physil. Chem. 316, 71 (1959)
19. NORTHROP u. KUNITZ, in ABDERHALDEN, Handb. d. biol. Arbeits-
methoden Abt. IV, Teil 2, 2213 (1936)
20. R.P. REDFIELD u. C.B. ANFINSEN: J. biol. Chem. 221, 385 (1956)
21. B. LEIBOLD u. G. BRAUNITZER: Z. physiol. Chem. 315, 271 (1959)
22. F. LEUTHARDT, Lehrb. d. physiolog. Chemie, 1957, S. 187
23. PETERS, LOGAN u. SANFORD: Biochem. Biophys. Acta 30, 88 (1958)
24. W. KAUZMANN in "the Mechanism of Enzyme Action" J. Hopkins Pr.,
Baltimore, 1954, S. 72
25. E. STAHL: Chemiker-Ztg. 82, 323 (1958)
26. E. MERCK: Druckschrift Aluminiumoxyd G, Kieselgur G, Kieselgel G
für Dünnschichtchromatogr., Darmstadt 1960
27. Th. WIELAND u. G. PFLEIDERER: Angew. Ch. 67, 257, (1955)
28. F.G. FISCHER u. H. DÖRFEL: Z. physiol. Chem. 297, 278 (1954)
29. Th. WIELAND, G. PFLEIDERER u. K. RAJEWSKY: Z. f. Naturf.
Bd. 15 b, Heft 7, 434, (1960)

30. Th. WIELAND u. G. PFLEIDERER: Ann. of the N.J. Acad. Sci.
Bd. 94, 691 (1961)
31. V.H. INGRAM: Nature 180, 326 (1957)
32. V.H. INGRAM: IV. Internat. Kongress f. Biochemie, Wien (1958)
33. Zusammenfassung: A. BUTENANDT:
Schriftreihe d. Arbeitsgem. f. Forsch. d. Landes
Nordrhein-Westfalen, Heft 62, Westdeutscher V., Köln, 1960
34. G.W. BEADLE: Chem. Rev. 37, 15 (1945)
35. Fr. BÜCHNER: Allgemeine Pathologie, V. Urban & Schwarzenberg,
München 1959, S. 34
36. MONOD: Angew. Ch. 22, 685 (1959)
37. W. BEERMANN: Mosbacher Coll. d. Ges.f.Physiol.Chem.
Mosbach (1962)
38. G. PFLEIDERER u. E.D. WACHSMUTH: Biochem.Z. 334, 185 (1961)
39. E. APPELLA u. C.L.MARKERT: Biochem. Biophys. Res.Comm.
Vol. 6, Nr. 3, 171 (1961)

L e b e n s l a u f

Am 12. 11. 1936 wurde ich in Frankfurt als Sohn des Universitätsprofessors Boris Rajewsky und seiner Ehefrau Olga, geb. Kromm, geboren. Nach Besuch der Grundschule und der Höheren Schule in Friedberg und Frankfurt/M. legte ich am 1. März 1956 am Freiherr vom Stein-Realgymnasium in Frankfurt/M. die Reifeprüfung ab und studierte anschließend Medizin an den Universitäten Frankfurt und München. Das Staatsexamen bestand ich im Februar 1962 mit dem Urteil "sehr gut".

Verzeichnis

Im Jahre 1910 wurde in Frankfurt am Main
das Verzeichnis der in der Stadt
Frankfurt am Main, Groß- und Klein-
handels- und Gewerbebetriebe in der Statistik
des Handels- und Gewerbes für das Jahr 1910
aufgeführt. In dem Verzeichnis sind die
Betriebe in der Statistik des Handels- und
Gewerbes aufgeführt, die in der Statistik
des Handels- und Gewerbes für das Jahr 1910
aufgeführt sind. Das Verzeichnis ist in
zwei Teile gegliedert: der erste Teil
enthält die Betriebe in der Statistik
des Handels- und Gewerbes für das Jahr
1910, der zweite Teil enthält die
Betriebe in der Statistik des Handels-
und Gewerbes für das Jahr 1911.

